Ministère de l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique

P 4228

COMPTES RENDUS ANNUELS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

I. N. R. A.
SERVICE DE DOCUMENTATION
25. OCT. 1982
UNITE CENTRALE DE VERSAILLES

VOL. 4 (2)

1975

INRA

Centre de Recherches d'AVIGNON

Domaine St Paul, 84140 Montfavet

(France)

Titre abrégé pour les citations : *C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 1979, 8.*

LB-5

SOMMAIRE (fin)

ANNEXE

I. Bibliographie du Laboratoire 27

1° rappels de 1972-73 28

2° parutions de 1974 à 1975 30

3° quelques rappels utiles de biochimie végétale . . . 33

Ouvrage en préparation 34

II. FIGURES 37

III. EXEMPLE D'ANALYSE "TOPIQUE" 45

IV. FICHES - PROGRAMMES

Tableau 1 46

Tableau 2 47

SOMMAIRE (suite) -

VII - BIBLIOGRAPHIE 15

VIII - PROJETS POUR 1976

① Enzymologie 16

② Les races d' Abeilles 16

③ Les Lipides 16

④ Les Glucides 17

⑤ L' Ethylène 17

⑥ Travaux de dépouillement et rédaction 17

⑦ Rédaction d'un ouvrage 17

⑧ Mission de formation 18

Deuxième Partie : RAPPORT ADMINISTRATIF

I. BILAN BUDGETAIRE 1975 19

a) dépenses d'équipement 19

b) dépenses de fonctionnement 20

II - DEMANDES POUR 1976

1° Le Budget - (Equipement / Fonctionnement) 21

- Résumé de l'évolution budgétaire depuis 1972 . . . 22

2° Demandes en personnel permanent 23

III - FONCTIONNEMENT DU LABORATOIRE EN 1975

1° Personnel ayant participé de diverses manières à la réalisation des travaux 24

2° Quelques remarques concernant le déroulement des Travaux 25

CONCLUSION 26

SOMMAIRE

INTRODUCTION 4

Première Partie : RAPPORT SCIENTIFIQUE

I. BREF RAPPEL DU BILAN DU PREMIER SEMESTRE ... 6

II. RECHERCHES ENZYMOLOGIQUES CHEZ L'ABEILLE

a) derniers travaux sur les α-glucosidases 8

b) zymogrammes de l'hémolymphe de 3 races 8

III. LES PROTEINES DE L'HEMOLYMPHE

① Travaux chez l'Abeille

Comparaison des races 9

Inter-relations entre fractions protéiques 9

Influence de la photopériode 10

Comparaison des colorants protéiques 10

② La protéinémie chez Noctua pronuba ... 11

IV. RECHERCHES SUR LES LIPIDES

① Microtechniques d'analyse quantitative 11

② Application aux œufs d'Ephestia 12

③ Les pigments du miel 12

V. RECHERCHES SUR LES GLUCIDES

a) analyse des œufs d'Ephestia ... .13

b) analyse des pucerons 13

VI. L'ETHYLENE METABOLIQUE EMIS PAR LES POMMES

a) Méthodologie 14

b) Résultats 14

INTRODUCTION

Ce compte-rendu des travaux de 1975 constitue déjà le 3e Rapport Annuel du Laboratoire de Biochimie.

Après une période de latence consacrée, en 1972 à la Pyrale du Riz, le laboratoire "néonate" a débuté avec des moyens de fortune, mais beaucoup de projets, en 1973.

Le premier bilan de fin d'année montrait alors la diversité des sujets abordés : les protéines de l'Abeille (premier thème proposé), les métabolites libres de différents insectes et ceux des milieux d'élevage, la vitamine C chez les lépidoptères, les glucides du miel (contrat EDF) et déjà quelques collaborations extérieures (Agronomie).

Au début de 1974, l'organisation du laboratoire bénéficiait d'un premier effort d'équipement. Le programme de travail se caractérisait par l'approfondissement des recherches sur les protéines de l'Abeille et sur l'acide ascorbique, ainsi que la mise au point de micro-techniques d'analyse, en premier lieu sur les glucides et en enzymologie.

Les recherches enzymologiques étaient alors développées, à titre de prospection, dans plusieurs directions : phosphatases, estérases, oxidases, avec déjà quelques conclusions intéressantes. Le programme d'étude des lipides annoncé dès 1973, ne pouvait être encore abordé faute de temps et de moyens.

D'autres sujets (dégradation des métabolites dans les milieux d'élevage intérêt des protéines d'insectes en nutrition animale) étaient mis en réserve en raison de l'intérêt moins urgent manifesté par les demandeurs, et d'une portée scientifique plus restreinte.

La sélection ainsi amorcée s'est accentuée en 1975 : certains thèmes ont donc été plus spécialement développés (la glycémie et les α-glucosidases chez l'Abeille) et d'autres, déjà bien avancés en 1974 ont été soumis à l'épreuve des contrôles de reproductibilité (protéinémie comparée des races d'Abeilles) sans exclure, toutefois, certaines interventions ponctuelles de courte durée (échantillons EDF, protéinémie des lignées de Noctuelles, pigments du miel) et de nouvelles collaborations extérieures, répondant à des demandes plus nombreuses (Glucides des pucerons, lipides et Glucides des œufs d'Ephestia, Ethylène des pommes ...). Certaines constituent, d'ailleurs, l'amorce de projets à suivre en 1976.

La poursuite du dépouillement et de l'interprétation des travaux des années antérieures est venue ajouter un supplément de résultats expérimentaux à ceux de l'année en cours : c'est pourquoi un premier bilan a dû être dressé sous la forme d'un "Rapport Semestriel d'activité 1975" évitant au rapport annuel le rappel de longues données numériques.

PREMIERE PARTIE :

RAPPORT SCIENTIFIQUE

I. BREF RAPPEL DU BILAN DU PREMIER SEMESTRE.

① Les travaux sur l'acide ascorbique se sont déroulés en 4 étapes :
- Thermodynamique de la dégradation oxydative dans les milieux d'élevage ;
- Relations quantitatives entre la composition des larves et celle du milieu nutritif ;
- Détermination des paramètres d'oxydation en acide déhydro-ascorbique ;
- Application à la comparaison de l'influence de l'acide ASC. et de l'acide déhydro-ASC. sur les constituants biochimiques de l'hémolymphe de Lasperesia

Cette dernière étape s'est achevée au cours du premier semestre en ce qui concerne les glucides. Les précédentes en sont au stade de la rédaction et la première en cours de publication ([8])

② Les proteines de l'hemolymphe ont été analysées comparativement chez plusieurs races d'Abeilles aux stades de larves, nymphes et hivernantes à la suite des résultats encourageants obtenus en 1974 ([10]). Les analyses ont été répétées et leur exploitation statistique poursuivie : la publication des résultats est en cours ([11]). Les premiers éléments positifs ont été enregistrés quant à l'étude des hybrides ([13]).

③ Les proteines de l'hémolymphe de Noctua pronuba ont été analysées quantitativement et classées par analogie avec le spectre protéique défini chez l'Abeille ([10])([11]).

④ Les techniques d'analyse micro-quantitative des glucides sont au point et publiées (14). L'analyse des acides aminés est en cours de rédaction et celle des lipides en voie de mise au point (Rapport Annuel: chap. IV). Les applications ont permis d'analyser la glycémie de l'Abeille à chaque stade du développement, et en fonction du nourrissement. Les premiers travaux sur les pucerons (Myzus persicae) ont eu pour objet de définir les rendements obtenus avec divers protocoles d'extraction. Enfin, Les échantillons EDF de miels et miellats ont été analysés et les résultats normalement transmis.

⑤ Les recherches sur les α-glucosidases de l'hémolymphe d'Abeilles ont été particulièrement approfondies (plus de 800 H d'expérimentation) en même temps que le mode de calcul des paramètres cinétiques enzymatiques bénéficiait de sérieux progrès.

La vitesse maximale, la constante d'affinité entre l'enzyme et le substrat et l'ordre de la réaction ont été déterminés à chaque stade (20) et en fonction du nourrissement. L'influence du glucose comme effecteur a été démontrée et les mécanismes d'action décortiqués (18)(19). L'existence d'une forme de régulation de la glycémie est suggérée. Certaines notions originales concernant la cinétique enzymatique seront publiées après une mise au point minutieuse et divers contacts.

⑥ L'analyse des estérases-acétiques par électrophorèse sur plaques de gels de polyacrylamide avec gradient est opérationnelle; plusieurs isozymes ont été mises en évidence et l'étude de différentes colonies par CORNUET a permis de montrer des différences dans la fréquence d'apparition de certaines fractions. Les résultats apportent des éléments originaux par comparaison avec la bibliographie.

II - RECHERCHES ENZYMOLOGIQUES CHEZ L'ABEILLE -

a) Derniers travaux sur les α-glucosidases

Les spectres isoenzymatiques ont été analysés et l'activité relative de chaque fraction α-glucosidasique calculée à chaque stade du développement (les premières conclusions sont sous presse : elles accompagnent le bilan des paramètres d'activité au cours du développement)(20).

Le mécanisme d'inhibition par le glucose, dans le cas particulier des naissantes (où l'ordre de réaction reste égal à 1), a confirmé la relation linéaire entre la concentration en inhibiteur et la valeur de la constante d'affinité apparente. La représentation graphique du phénomène permet le calcul de l'affinité entre l'enzyme et le substrat pur et entre l'enzyme et l'inhibiteur pur (19)

Au cours de cette expérience, les paramètres cinétiques sont déterminés à partir du même extrait initial dont l'enzyme travaille successivement en présence de concentrations croissantes en glucose introduit in vitro. L'évolution de la glycémie est contrôlée in situ par microméthode (prélèvements de 5 µl).

b) Zymogrammes de l'Hémolymphe de 3 races.

L'activité de 19 enzymes différentes a été recherchée dans l'hémolymphe d'Abeilles hivernantes - Les principales sont dans l'ordre décroissant : β glucosaminidase, α glucosidase et β galactosidase, phosphatase acide, leucine-amino peptidase, estérase-C8 phospho amidase, α galactosidase et α-mannosidase (cette dernière activité n'étant pas forcément due à une enzyme spécifique).

L'étude du spectre enzymatique a été répétée comparativement chez Mellifica, Caucasica et Ligustica : les trois races se sont montrées extrêmement voisines et seule l'analyse photométrique a permis d'observer de légères différences au niveau de la phosphatase alcaline et de la β glucosidase, qui figurent parmi les plus faiblement actives.

La signification des variations reste, de ce fait, incertaine.

III. LES PROTEINES DE L'HEMOLYMPHE.

① Travaux chez l'Abeille.

a) Comparaison des races.

L'analyse statistique des derniers résultats a permis de dresser un bilan des possibilités de comparaison des races Mellifica, Caucasica, Ligustica et Carnica prises deux à deux. Généralement, des différences significatives ont été obtenues, à divers stades, à partir d'échantillons de 4 à 5 Abeilles de chaque souche. La publication est en cours (13). La fraction BII-1 du spectre, 3 fois plus élevée chez Caucasica que chez les autres races, permet de distinguer le phénotype hybride du phénotype parental à partir de l'analyse de 3 individus.

Enfin, l'étude des inter-relations quantitatives entre fractions protéiques a permis d'établir un mode de classification linéaire des races le long d'une droite de régression (13) (Fig. 1), avec possibilité d'exprimer mathématiquement un indice de "distances relatives".

b) Inter-relations entre fractions protéiques.

Chez l'Abeille d'hiver, l'étude des inter-relations entre fractions protéiques a montré que certaines fractions, liées par des relations linéaires, ont des poids moléculaires échelonnés selon les rapports 1-2 et 4 (de l'ordre de 90 000, 190 000 et 380 000)

ce qui évoque un mécanisme de polymérisation réversible. D'autre part, la coïncidence entre les deux plus "lourdes" de ces fractions et les bandes d'activité α-glucosidasique se confirme au fil des expériences : un tel résultat pourrait alors apporter un progrès très sensible à l'interprétation des travaux de cinétique α glucosidasique.

Enfin, les variations de la fraction protéique F(1) chez l'Abeille noire montrent que la distribution se répartit en plusieurs classes de concentrations (fig. 2) liées aux castes et aux périodes de l'année. De même, les proportions entre les fractions du groupe A diffèrent chez l'adulte, selon la période de l'année :

c) Influence de la Photopériode.

A la demande d'un Chercheur universitaire étranger (Dr John KEFUSS) les spectres protéiques d'Abeilles soumises à différentes photopériodes ont été analysés selon la classification établie au laboratoire ([10])([11]

Bien que les gels qui nous ont été soumis aient migré en présence de détergent (S.D.S.) et que la révélation des protéines ait été opérée avec un colorant différent, les fractions homologues ont été retrouvées qualitativement et quantitativement

Nos analyses ont montré que la photopériode exerce une influence sur le spectre protéique et que ces différences vont dans le même sens que celles observées dans la nature, entre l'été et l'hiver par exemple (§ b).

d) Comparaison des colorants protéiques.

En relation avec le problème précédent, le rendement quantitatif du Noir Amido 10B a été de nouveau comparé à celui du "bleu de Coomassie" sur le spectre de l'Abeille. Les résultats montrent que les différences sont plutôt dues à la technique de coloration qu'à la nature du colorant.

② La Protéinémie chez Noctua pronuba.

Les analyses effectuées au cours du 1er semestre ont été reproduites sur les mêmes lignées (caractérisées par POITOUT selon la couleur des adultes). Chez les larves, il se confirme que des différences existent entre lignées, sans qu'il y ait obligatoirement corrélation avec le caractère de couleur étudié par POITOUT.

IV RECHERCHES SUR LES LIPIDES

①. Microtechniques d'analyse quantitative.

La première étape, sur la séparation des principales classes de lipides animaux, a été franchie au moyen de la micro chromatographie en couche mince sur gel de Silice (Merck). L'étude d'une centaine d'éluants différents a été réalisée dans les systèmes de séparations uni et bi-dimensionnels (fig.3-4). Les Cholates, phospholipides, acides gras libres ou estérifiés, stéroïdes, et glycérides peuvent être séparés à partir d'un mélange; la révélation est effectuée au moyen de l'acide perchlorique, plus favorable sur les supports utilisés que les réactifs acides les plus couramment utilisés.

Pour chaque classe, des courbes d'étalonnage ont été établies; la sensibilité moyenne de la méthode se situe au voisinage de 2 nanomoles dans la plupart des cas.

La révélation au moyen du réactif phosphomolybdique, plus sensible dans certains cas, est moins universelle. L'utilisation de dichloro-2'-7' fluorescéine est à l'étude : elle nécessite la mise au point des méthodes d'enregistrements photométriques par fluorimétrie.

La fig. 3 montre un chromatogramme bi dimensionnel d'étalons et la fig. 4 illustre un exemple de séparation des classes de lipides, dans le système uni-dimensionnel, à partir d'un extrait d'oeufs de Lépidoptères.

De nouvelles méthodes ont été également mises au point pour l'analyse des pigments chlorophylliens et caroténoïdes, en vue de travaux sur les pigments du miel, ceux des insectes et de leurs plantes-hôtes.

Différents supports (Alumine, Silice, Cellulose) ont été employés et c'est finalement de nouveau le gel de silice Merck qui a donné les meilleurs résultats (fig. 5). La méthode apporte un net progrès sur les techniques antérieures utilisant l'Alumine Eastman-Kodak ([21]).

② Application aux oeufs d'Ephestia.

L'analyse des lipides des oeufs d'Ephestia est en cours. Les premiers travaux ont été consacrés à l'étude du processus d'extraction. En milieu éthère, les cholates, acides gras libres et stérides sont extraits les premiers, suivis par les glycérides. La fig. 4 présente un chromatogramme obtenu à partir d'une solution résultant de 3 extractions successives.

③ Les pigments du miel.

L'analyse des pigments liposolubles des miels et des pollens montre que les caroténoïdes sont présents à l'état dégradé. Certaines colorations, par ailleurs, pourraient être imputables à des pigments du type anthocyanes, principalement dans les pollens.

L'identification des pigments du miel nécessitera donc une étude relativement longue. L'âge du miel semble jouer un rôle important.

V. RECHERCHES SUR LES GLUCIDES.

a) L'analyse des oeufs d'Ephestia a permis de séparer 13 constituants révélés par le Naphtalène diol-1-3 en milieu sulfurique. 5 ont été identifiés, les autres font l'objet de la suite des recherches. Les fig. 6 et 7, illustrent respectivement une séparation unidimensionnelle et une séparation bidimensionnelle comparativement à des solutions étalons. (Recherches en liaison avec VOEGELE)

b) L'analyse des glucides de pucerons se poursuit en liaison avec les travaux de MASSONIE, sur des lots d'insectes élevés sur milieux synthétiques. Les analyses en cours portent sur l'influence des acides organiques, du lysozyme et de l'auréomycine.

VI. L'ETHYLÈNE METABOLIQUE EMIS PAR LES POMMES

a) Méthodologie.

L'analyse de l'éthylène a été entreprise en liaison avec la station d'Agronomie (laboratoire de Madame HUGUET). La chromatographie en phase gazeuse sur colonne d'Alumine modifié type ST 4 (Giravions-Dorand) a été mise au point à l'aide de gaz-étalon. Différents essais ont permis de définir les meilleures conditions possibles pour les prélèvement au niveau des fruits. (enceintes fixées à l'aide de mastics sur l'épiderme, ou aiguilles insérées dans la cavité calicinale).

b) Résultats.

La campagne 1975 a permis d'établir un premier bilan des variations au cours de la maturation (le dégagement augmente dans des proportions de 1 à 100) et de comparer l'émission d'éthylène par des pommes provenant d'arbres en culture hydroponique soumis à différentes carences. Les résultats semblent justifier la reconduction de cette coopération dont le laboratoire a bénéficié sur le plan de l'équipement et de l'aide technique.

5 composants gazeux (de C_1 à C_4) sont présents dans les échantillons (fig. 8) en proportions variables selon le stade d'évolution du fruit.

En fonction des traitements nutritifs, l'émission d'éthylène présente des différences au niveau de la quantité produite ainsi que de la cinétique du dégagement.

VII - BIBLIOGRAPHIE

La mise au point du code de classement du fichier bibliographique a été poursuivie sur les bases de l'expérience acquise depuis 10 ans.

Le fichier s'est enrichi de centaines d'analyses supplémentaires dans les domaines d'activité actuels ou prévisibles du Laboratoire.

Un document complet présentera prochainement les détails du fonctionnement (thesaurus)

- Code synoptique rapide.
- Code détaillé classé par rubriques (dans l'ordre des numéros).
- Code détaillé classé par index-matières (ordre alphabétique).
- Classement complémentaire (ou transitoire) idéologique (alphabétique)

Un certain nombre de principes successivement appliqués aux classements suivants : ...

- "Effets génétiques et biochimiques des rayonnements ionisants sur les plantes" (1965-67)
- "Biochimie des mutations chlorophylliennes" (1967-71)
- "Pyrale du Riz"

à savoir : choix mnémotechnique des couleurs (rouge = sang, vert = chloroplylle) et analogie de couleurs pour une même idée générale, d'une rubrique à l'autre ("rose-bébé" pour : Génétique, Reproduction, ADN, gamètes, etc....)

... ont été appliqués au classement actuel du fichier de la Station de Zoologie d'Avignon. (7)

Une participation régulière au fichier central INRA dans le domaine biochimique est maintenant envisageable.

VIII - PROJETS

L'exposé des résultats de 1975 suggère l'orientation des travaux à venir : cependant, une durée strictement limitée sera prévue pour le temps consacré à chaque sujet au cours de 1976.

① Enzymologie.

Chez l'Abeille d'abord, puis, éventuellement chez d'autres insectes (Noctuelles), les spectres enzymatiques spécifiques de différents organes seront analysés en vue de déterminer les meilleures conditions d'application à la comparaison des lignées (coût en réactifs : 1500 F)

D'autre part, les différentes formes moléculaires de l'α-glucosidase de l'hémolymphe devraient être examinées en fonction des modifications induites des propriétés cinétiques de l'enzyme.

② Les races d'Abeilles.

Une opération d'équipe devrait aboutir à la confrontation générale des diverses méthodes de comparaison des races (biométrie, protéinemie, zymogrammes). Cette étape s'impose avant que soit abordée ultérieurement, avec plus de précision, l'étude des hybrides puis celle des écotypes, qui nécessiteront également une amélioration des performances techniques de l'électrophorèse. (coût : 500 F en 1976).

③ Les Lipides.

Les œufs d'Ephestia feront l'objet d'une étude détaillée nécessitant la mise au point de plusieurs types d'analyses et l'emploi de nombreuses substances étalons (coût : 4500 F)

Les différentes noctuelles seront comparées au niveau de la composition quantitative de leurs principales classes de lipides (coût 500 F).

④ Les Glucides.

L'analyse des oeufs d'Ephestia ainsi que celle des pucerons se poursuivront sous l'aspect qualitatif et quantitatif (Coût 500 F)

⑤ L'Ethylène.

L'expérience encourageante de 1975 permettra d'aborder éventuellement la suite avec une efficacité accrue. La contribution extérieure aux frais de fonctionnement devrait être de l'ordre de 1600 F.

⑥ Travaux de dépouillement et rédaction.

les calculs, l'interprétation des résultats et la rédaction des travaux sur l'acide ascorbique, l'enzymologie, les protéines ainsi que les méthodes d'analyse demanderont encore de nombreux mois de travail.

⑦ Rédaction d'un ouvrage :

"Choix de microtechniques simples pour l'analyse biochimique quantitative, animale et végétale".

Les nécessités techniques du laboratoire, auxquelles s'ajoutent les demandes de stages de formation émanant de nombreux chercheurs INRA et universitaires, m'ont amené à entreprendre, en relation avec les éditions MASSON, la préparation de cet ouvrage dont une présentation provisoire figure en annexe. Le contenu sera illustré en grande partie par des travaux personnels.

Des éxperiences complémentaires destinées à peaufiner les résultats avec applications aux insectes seront donc effectuées au cours de 1976.

Elles auront pour conséquence directe d'accroître le potentiel analytique futur du laboratoire de biochimie. (Coût en réactifs et produits étalons : 2000 F). Temps prévu : 9 mois complets au moins

⑧ Mission de formation.

L'aide aux Chercheurs du Département, dans le domaine de la Biochimie, et en particulier l'accueil de stagiaires pour des périodes de formation adaptées à leurs problèmes, constitue, de fait, l'une des missions naturelles du Laboratoire.

Compte tenu de la demande, cette mission sera assurée en principe dès 1976 dans toute la mesure des possibilités matérielles dont disposera le laboratoire, à savoir :

- place disponible, frais de fonctionnement, temps de travail pouvant être réservé à l'enseignement.

- Premiers stages acceptés : M. Ferran (Glucides
  Acides aminés
  Lipides)

DEUXIÈME PARTIE

RAPPORT ADMINISTRATIF.

I. BILAN BUDGETAIRE 1975

a) Dépenses d'Equipement

Engagement de dépense : ... 22500 F

Achats effectués :

Appareils d'électrophorèse sur plaques : ...	11 964,00
Armoire de réfrigération congélation : ...	5 930,00
Pompe à vide pour lyophilisateur : ... (*)	4 554,00
TOTAL :	22 448,00

(*) Livraison attendue - Facturation début 1976

Crédits extérieurs au dépt de Zoologie :

- Agronomie / Sciences du Sol,
  Matériel pour chromatographie en phase gazeuse : 2 300,00

TOTAL GENERAL : 24 748 F

b) Dépenses de fonctionnement.

Catégorie de dépense :	crédit par Apiculture	crédit par St. Zoologie	Total
Produits chimiques	1937,42	-	1937,42
Matériel de Laboratoire	2047,00	-	2047,00
Bibliothèque (reliquat de 1974)	282,48	-	282,48
Tirés à part/Doc. CNRA	.5,60	25,55	31,15
Missions	713,	1558,50	2271,50
Stages	-	1000,	1000,
Fournitures de bureau et papeterie	275,	150,	425,
Affranchiss^{t} courrier :	81,00	-	81,00
Photocopies Xérox	250,		250,
		Total :	8325,55

Dépenses prévues mais non engagée faute de budget :

Produits chimiques	500,94
Matériel de Labor.	717,60
Ouvrages urgents	2253,60
2e total (non couvert)	3472,14 (*)

Engagement total théorique : **11 797,69**

(*) Report sur 1976

II DEMANDES POUR 1976

II-1°- LE BUDGET -

II-1°-1- La demande d'équipement pour 1976 s'inscrit comme suit

(demande transmise le 24/7/75)

1ère urgence : Micro balance analytique SETARAM

Type γ-21 N sensible au µg

Prix TTC juillet 1975 : 16 560,00

+ Risque d'augmentation évalué à 15 % 2 484,00

Total : 19 044,00

II-1°-2- Les besoins en fonctionnement ont été établis compte-tenu de l'évolution des 3 années écoulées et des particularités prévues pour 1976 - (Prix T.T.C., augmentations prévues incluses)

Catégorie de dépense (sous réserve de D.M. de 2e semestre) -	engagement prévu
Produits chimiques	3500
Matériel de Laboratoire ...	4 000
Ouvrages de bibliothèque (urgent)	3 000
Tirages doc. CNRA	500
Missions et/ou accueil de stages	3 000
Fournitures de bureau, timbres, papeterie, photocopies etc. ...	1 000
Total en Fonctionnement:	15 000

Soit un engagement total (non compris les effluents)

de: 34 044,00

II-1°-3- Résumé de l'évolution budgétaire depuis 1972

Année -	Equipement	Fonctionnement	Total
1972	5 602, 17	2 722,71	8 324,88
1973	51 553, 20	21 322, 81	72 876,01
1974	25 514, 00	9 325, 19	34 839,91
1975	24 748, 80	8 325, 55	33 074,35
1976 (Prévision)	19 044,00	15 000,00	34 044,00

Le détail des programmes, des dépenses, et des résultats, peut être consulté dans les rapports suivants :

- Rapport 1972
- Rapport annuel du Laboratoire de biochimie pour 1973
- " " " " " " " 1974
- " Semestriel " " " " " 1975
- " annuel " " " " " 1975

II-1°-4- Conclusions

L'année 1973 a été marquée par un effort d'équipement et de fonctionnement (petit équipement, stock de produits de base etc.) et les budgets suivants reflètent le roulement établi, destiné à valoriser les acquisitions - Le budget 1976, encore austère, a été établi dans le même esprit. Un nouveau coup de pouce à l'équipement pourrait s'avérer utile en 1977 ou 1978 -

II - 2° DEMANDES EN PERSONNEL PERMANENT

Compte tenu du rythme de roulement actuel des travaux expérimentaux, auquel il convient d'ajouter le temps nécessaire à la bibliographie, au dépouillement des résultats, à la rédaction et à la gestion, il est extrêmement urgent, maintenant, d'adjoindre à l'équipe permanente actuelle (réduite à 2 personnes) :

a) Un cadre scientifique ou technique, niveau 3e Cycle,

- auquel sera confié le développement de certains sujets dont la portée scientifique et l'intérêt agronomique s'avèrent très importants à la lumière des résultats préliminaires, mais qui ne peuvent être actuellement approfondis au fur et à mesure, de façon satisfaisante, faute de temps.

b) Un Technicien Supérieur (niveau IUT, 2e cycle, p.ex.)

- ayant pour mission d'apporter une contribution permanente aux travaux analytiques (Spectrophotométrie, Chromatographie en Phase gazeuse et liquide) avec pour double objectif : un gain de temps pour les Chercheurs, et une amélioration constante à apporter à la qualité des manipulations et aux performances techniques du matériel.

c) Un collaborateur administratif et technique (Niveau B.T.S.) à mi-temps,

- pouvant apporter à la fois une aide de secrétariat, et de documentation scientifique, de bibliographie (et un appoint technique en périodes de pointes au Laboratoire)

De nombreuses candidatures dont plusieurs très sérieuses et particulièrement dignes d'intérêt sont en attente dans les 3 cas indiqués ci-dessus.

III_ FONCTIONNEMENT DU LABORATOIRE EN 1975.

III_1°_ Personnel ayant participé de diverses manières à la réalisation des travaux_

M. BOUNIAS (Temps plein)

Madame PARIS (Temps plein) - Technicien -

M. CORNUET (Génétique biochimique chez l'Abeille)

Mme HUGUET (M.R., responsable du programme éthylène) (Agronomie)

Mme BONAFOUS (chromatographie en phase gazeuse de l'éthylène)

Mlle VAILLEN_ Stage universitaire (Juillet-Août) : Analyse des lipides (Ecole sup. de Biologie de Paris)

M. GONNET_ (Sucres du Miel : échantillons E.D.F.)

M. FRESNAYE_ (Insémination artificielle des Reines d'Abeilles)

M.M. PARIS Alain
- PARIS René
- BLANC Jean
} Entretien des ruchers, prélèvements de cadres.

Mme PLATZ_(dactylographie) (mi-temps partagé).

Mme GREMBERT_(Entretien des locaux)(mi-temps partagé).

Mme BOUNIAS_(participation technique, bibliographie et dactylographie)

Dr. John KEFUSS_(séparation des protéines d'Abeilles soumises à différentes photopériodes)(Université, Toulouse)

M. POITOUT_(Elevage et génétique des Noctuelles analysées)(AVIG

M. MASSONIÉ_(Elevage et traitements des pucerons analysés)(INRA-Bordea

M. VOEGELE_(Préparation des oeufs d'Ephestia analysés)(INRA-Antibe

Mlle GIMENEZ_(grâce à l'obligeance de M. LALIÈRE)(dactylographie)_

III - 2°- Quelques remarques concernant le déroulement des travaux.

- On rappelle le depart aux Antilles de M. CORNUET, auquel a été confié une partie du matériel d'électrophorèse sur plaques avec gradient de polyacrylamide, afin d'assurer un maximum de continuité dans le déroulement de son programme.

- Le stage universitaire d'été a été consacré à la formation d'une élève-biochimiste dans le domaine de la chromatographie en couche mince, ainsi que de la cinétique chimique.

- Des demandes d'analyses ponctuelles (par exemple: contrôle des teneurs en vitamine C de milieux d'élevage préparés à la station de Zoologie et présentant des aspects anormaux) ont été satisfaites au fur et à mesure de leur arrivée. (fiche-type de résultats en Annexe.)

- Le programme "éthylène" s'est déroulé comme prévu en Septembre - Octobre avec l'aide technique extérieure adéquate.

- Une aide supplémentaire a été requise a différentes occasions, en raison du surcroît de travail et du manque de personnel (Aide des Services Généraux pour la dactylographie, aide familiale pour certaines manipulations, pour la dactylographie ainsi que la bibliographie)(etc.)...

CONCLUSION.

Le laboratoire de Biochimie a maintenant terminé sa période de mise en train : c'est un " néonate " qui a déjà pris de l'âge et s'apprête à Muer, afin de poursuivre harmonieusement son développement.

Il est très vraisemblable que le thème général de la Régulation enzymatique et métabolique demeurera l'une des dominantes de son activité, laissant cependant un minimum de place à des interventions "topiques" destinées, en particulier, à faire bénéficier d'autres chercheurs du potentiel expérimental désormais acquis.

Après l'effort initial de 1973-74, les demandes d'équipement ont été — et seront encore — délibérément réduites pendant quelque temps, afin de permettre un maximum de valorisation du matériel.

Les besoins les plus pressants se situent maintenant de façon évidente au niveau du personnel et des locaux.

C'est ainsi, que dans l'attente de la Mue impatiemment escomptée, l'année 1976 sera placée sous le triple signe :

de la Réflexion, de la Rédaction et de la Bibliographie,

afin de préparer avec sureté et précision l'intensification des recherches qui ne manquera pas de caractériser la période post-Mue des années à venir.

Avignon, le : 22 DEC. 1975

ANNEXE.

AU RAPPORT ANNUEL 1975

I. Bibliographie du Laboratoire.

(publications et rapports, de 1972 à 1975)

- Plan de l'ouvrage en cours de préparation.

II. Figures illustrant le texte.

III. Exemple d'analyse "topique."

IV. Fiches-programmes.

I_ BIBLIOGRAPHIE DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

I_1°_ Rappels de 1972-73.

(1) M. BOUNIAS, 1972_ La Pyrale du Riz, Chilo suppressalis WLK (lepid., Pyralidae, Crambinae). Eléments d'identification rapide. Bull. Inf. Rizic. Fr., 139, 11-13

(2) ———, 1974_ La Pyrale du Riz, Chilo suppressalis WLK (lepid., Pyralidae, crambinae). Mise au Point Bibliographique. Rapport INRA, 63 pp., 458 Réf. Bibl., 140 revues citées (*)

(3) M. BOUNIAS et Mme G. GUENNELON, 1974. Action de la toxine du Bacillus thuringiensis (Ber.) sur le développement de la Pyrale du Riz (Chilo suppressalis WLK., lepid., Pyralidae) Rapport INRA, 18 p., 20 réf bibl. (*)

(4) M. BOUNIAS, 1972_ Influence de la température sur le développement de la Pyrale du Riz (Chilo suppressalis WLK.) en élevage sur milieu artificiel_ Rapport INRA, 13 p., 10 réf. bibl. (*)

(5) M. BOUNIAS, 1972_ Bilan d'une première confrontation avec le problème de la Pyrale du Riz en Camargue (Chilo suppressalis WLK., lepid. Pyralidae, Crambinae)_ Rapport INRA, 25 p., 12 réf. bibl. (*)

(*) Ces rapports doivent paraître dans "Review of Applied Entomology" Des tirés à part ou des Xérocopies sont disponibles sur demande écrite.

...

I - 1° - (Suite)

(6) M. FERON et M. BOUNIAS, 1972. Lutte contre la Pyrale du Riz, Chilo suppressalis WALKER (Lep. Pyralidae) et protection de la Nature en Camargue - Projet de note - 5 pp. Dactyl.

(7) F. SORIA et M. BOUNIAS, 1972. Code de Classification Bibliographique utilisé à la Station INRA de Zoologie d'Avignon - Rapport : 18 pp. Dactyl. -

---

Suite :

Biochimie des insectes

→

I - 2° - Parutions de 1974 à 1975

(8) M. BOUNIAS et G. BONNOT, 1975-76 - Dégradation oxydative de l'acide ascorbique dans les milieux destinés à l'alimentation artificielle des lépidoptères phytophages.
Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., (sous presse)

(9) M. BOUNIAS, 1975-76 - Paramètres d'oxydation de l'acide ascorbique par l'eau oxygénée in vitro.
Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., (en préparation).

(10) _____, 1975 - Les Protéines de l'hémolymphe chez l'Abeille.
I - Larves, Nymphes et Naissantes
Apidologie, 3, 12p. (Sous presse)

(11) _____, 1975 - Les Protéines de l'hémolymphe chez l'Abeille.
II Adultes butineuses et hivernantes
Apidologie, 3, 14p. (sous presse)

(12) _____, 1975 - Détermination quantitative par électrophorèse en gel de polyacrylamide des principales fractions protéiques de l'hémolymphe de quelques races d'Abeilles
2e Coll. INRA de Biochimie, Maisons Alfort, 24-1-75, 13pp.

(13) _____, 1976 - Les Protéines de l'hémolymphe chez l'Abeille.
III - Comparaison du spectre protéique des ouvrières de différentes races - Apidologie, Juin 1976 (à paraître)

(14) M. BOUNIAS, 1976 - Micro-analyse quantitative de quelques métabolites de l'hémolymphe d'insectes - I_ Les Glucides libres. Analusis, 4, 7pp. (sous presse)

(15) M. BOUNIAS, 1975-76 - Modifications d'activité des α-glucosidases (E.C. 3-2-1-20) de l'hémolymphe au cours de la nymphose chez l'Abeille. C.R. Acad. Sc. (sous presse).

(16) _____, 1975 - Modifications d'activité de quelques enzymes de l'hémolymphe au cours du développement chez l'Abeille noire : Apis mellifica, mellifica L. C.R. IIe Coll. de Physiologie des Insectes, Strasbourg (Université Louis Pasteur) 2-3 Mai 1975 - "Physiologie du Développement - 4 pp.

(17) _____ 1975 - Analyse comparée des principales fractions protéiques de l'hémolymphe de différentes races d'Abeilles. C.R. 25e congrès International d'Apiculture (APIMONDIA). Grenoble, 8/14 Sept. 1975. Rés. Comm. p. 87, Texte : C.R. sous presse.

(18) _____ 1975 - Les α-glucosidases et la glycémie chez l'Abeille noire Apis mellifica, mellifica L. - C.R. 25e congrès international d'Apiculture (APIMONDIA). Grenoble, 8/14 sept 1975 - Rés. Comm. : p. 87. Texte : C.R. sous presse

(19) M. BOUNIAS, 1976 - Détermination graphique des paramètres d'inhibition enzymatique dans le cas d'un mécanisme de type K : application au contrôle de l'activité α-glucosidasique de l'hémolymphe d'Abeilles par le Glucose. C.R. Acad. Sc. : en préparation

(20) ———, 1976. Paramètres cinétiques de l'activité α glucosidasique de l'hémolymphe au cours du développement de l'Abeille noire - Apidologie, Juin 1976 (à paraître)

I-3°- Quelques rappels utiles de Biochimie Végétale -

(Extraits : 21 références de 1967 à 1974)

- liste complète sur demande -

(21) M. BOUNIAS, 1969. Une microméthode d'analyse quantitative par chromatographie en couche mince des sucres, amino-acides, pigments et cofacteurs éthérosolubles de plants d'Arabidopsis thaliana (L) HEYNH. Chimie Analytique, 51(2), 76-82.

(22) M. BOUNIAS et M. PACHECO, 1972. Role de la Leucine sur l'activité phosphatasique alcaline chez l'Orge. C.R. Acad. Sc. Série D, t. 275, 201-204.

(23) M. BOUNIAS, 1974. Intra-Cellular localization of L(U) ^{14}C-Leucine in Arabidopsis and Barley leaves. Arabidopsis Inform. Service (Frankfurt) 11, 21-23.

(24) M. BOUNIAS et M. PACHECO, 1974. La L. leucine et la L. aza-4-leucine, effecteurs allostériques de l'activité phosphatasique alcaline de l'Orge. C.R. Acad. Sc. Série D. t. 279, 691-694

(25) M. BOUNIAS, 1975. Modifications des relations quantitatives entre les pigments photosynthétiques et les acides-aminés libres chez quelques mutants chlorophylliens d'orge et d'Arabidopsis. Can. J. Bot., 53 (8), 708-719

OUVRAGE EN PREPARATION

CHOIX DE MICROTECHNIQUES SIMPLES

POUR L'ANALYSE BIOCHIMIQUE QUANTITATIVE

ANIMALE ET VEGETALE

(Titre provisoire)

GENERALITES

Ce recueil de techniques ne fait en aucun cas double emploi avec les volumineux ouvrages déjà parus, en particulier sur la chromatographie en couche mince (E. STAHL, Springer-Verlag, 1969, K. RANDERATH, Gauthier-Villars, 1971).

Il s'agit de fournir à l'utilisateur occasionnel (ou même permanent...) un choix de techniques présentant les qualités suivantes :

- simplicité de mise en oeuvre et d'emploi (..et coût peu élevé).
- Description précise de toutes les étapes de l'analyse (évitant certains tâtonnements et mises au point inutiles).
- Précision et reproductibilité des résultats.
- Sensibilité en analyse qualitative et quantitative.

Les méthodes proposées ne sont pas pour autant les plus exhaustives qui soient, mais elles offrent un excellent équilibre entre leurs performances, leur coût et leur facilité d'emploi. Elles font parfois appel au matériel "de fortune" pour permettre à des laboratoires peu équipés pour la Biochimie de pratiquer néanmoins une assez large gamme d'analyses. Leur description est illustrée d'exemples concrets d'applications obtenus par l'auteur et par ses collègues ayant utilisé des méthodes similaires.

../..

PLAN DE L'OUVRAGE

I - GENERALITES CONCERNANT L'EQUIPEMENT

I-1- Micro méthodes d'extraction et préparation des échantillons (broyages, concentrations etc...)

I-2- Dépôts sur couches minces (fabrication de micropipettes étalonnées ventilation etc...)

I-3- Cuves à chromatographie.

I-4- Colonnes à chromatographie.

I-5- Pulvérisateurs pour réactifs - Etuves.

I-6- Enregistreurs - Méthodes d'enregistrement et d'intégration des pics.

II - ANALYSE DE QUELQUES CONSTITUANTS BIOCHIMIQUES FONDAMENTAUX DE LA MATIERE VIVANTE.

Pour chaque catégorie d'analyse, le lecteur trouvera les indications suivantes :

Extraction
Purification
Chromatographie quantitative sur couche mince
Révélation chimique
Enregistrements quantitatifs
Exemples d'applications

II-1- Les Glucides.

II-2- Les Acides aminés.

II-3- Les Lipides : Acides gras et dérivés
Glycérides
Stéroïdes
Phospholipides
Glycolipides *

../..

II- 4- Les vitamines et cofacteurs lipo-solubles.

II- 5- Les pigments chlorophylliens et caroténoïdes.

II- 6- Les pigments Anthocyaniques et flavonoïdes.

II- 7- Les acides organiques.

II- 8- Les vitamines hydro-solubles.

II- 9- Les hormones végétales et animales.*

II-10- Les acides nucléiques *

II-11- Les complexes chromo protéiques.

II-12- Les protéines (par électrophorèse simple sur gel de polyacrylamide).

II-13- Les ptérines.

III - CAS PARTICULIERS D'UTILISATION

III-1- Molécules marquées au ^{14}C.

III-1.1- Glucides.

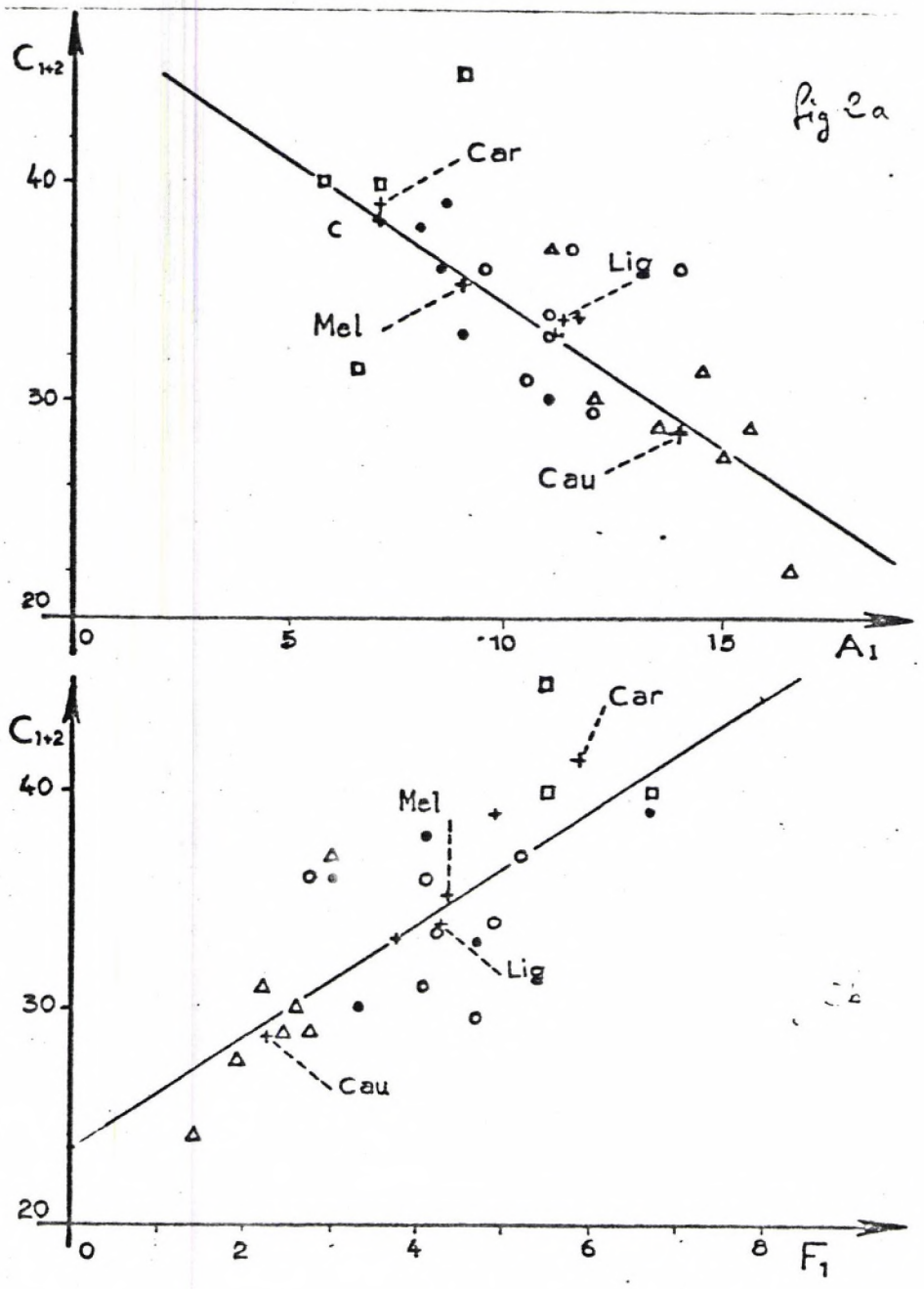
III-1.2- Acides aminés.

III-1.3- Pigments photosynthétiques.

etc...

(*) Selon le temps prévu pour la rédaction, un 2ème volume complémentaire pourrait être envisagé pour les composés signalés par un astérisque et ceux non mentionnés

FIGURES



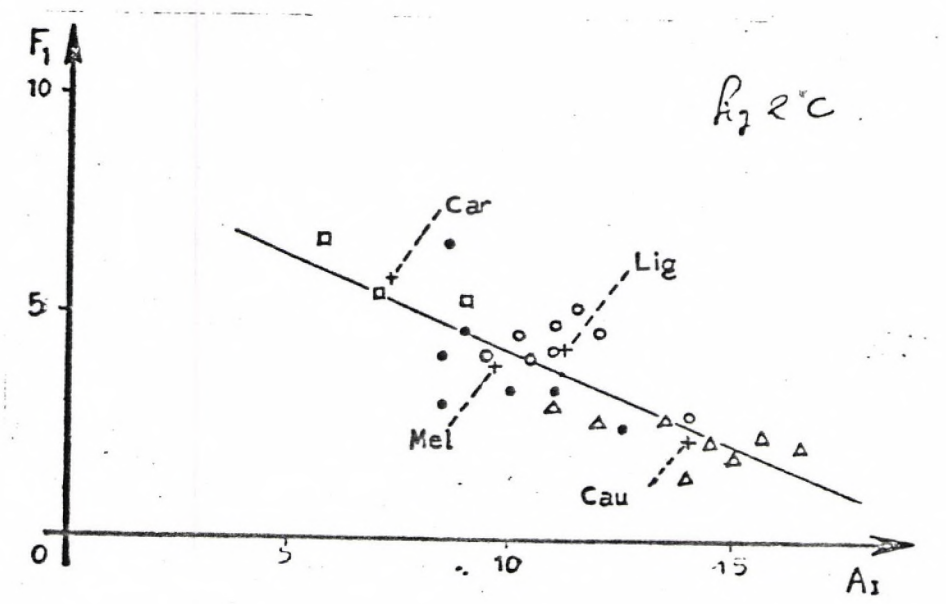


Fig. 1 Inter-relations entre fractions protéiques de l'hémolymphe chez diverses races d'Abeilles : ● = Mellifica, ○ = ligustica, □ = Carnica, △ = Caucasica.

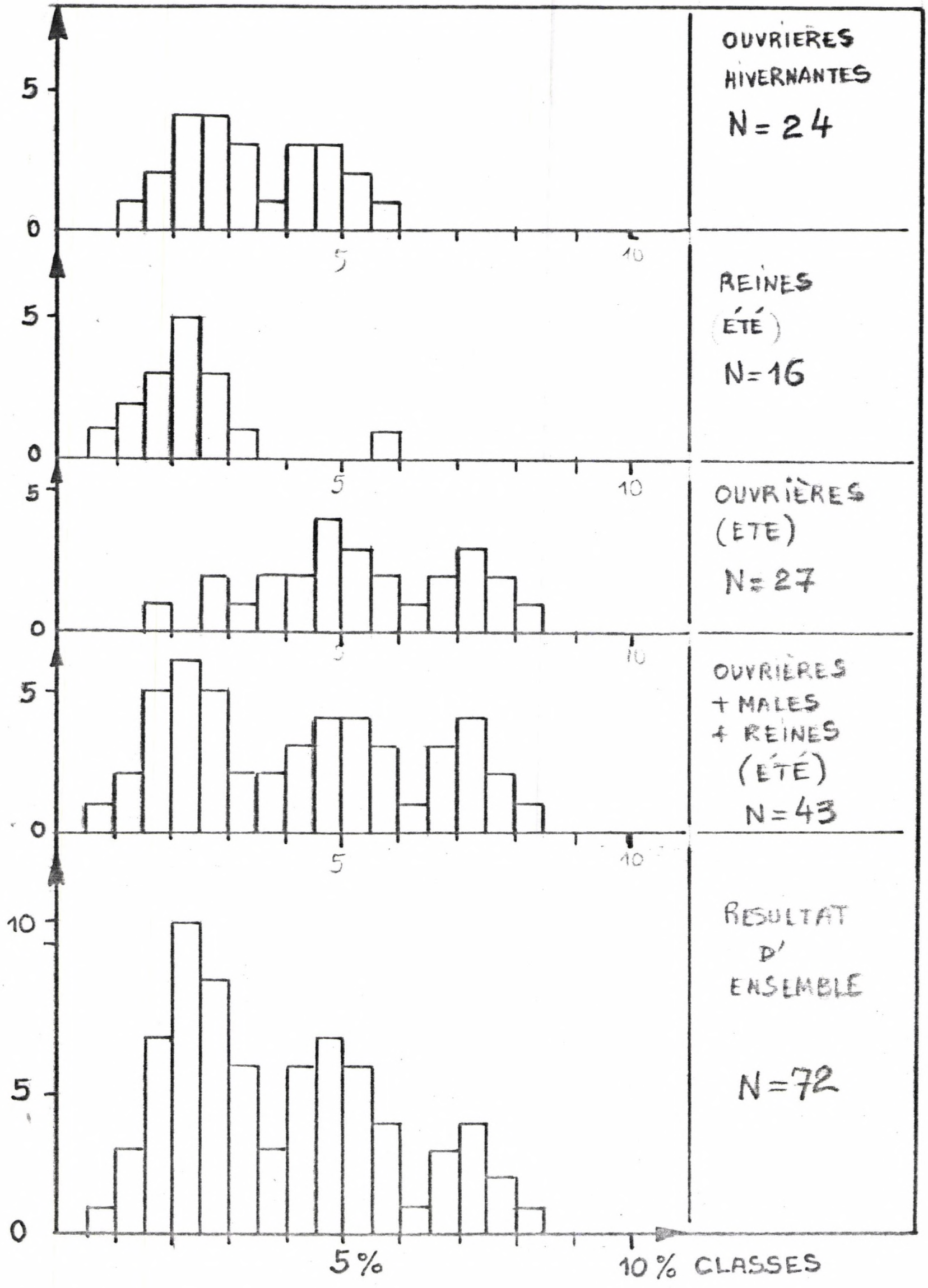
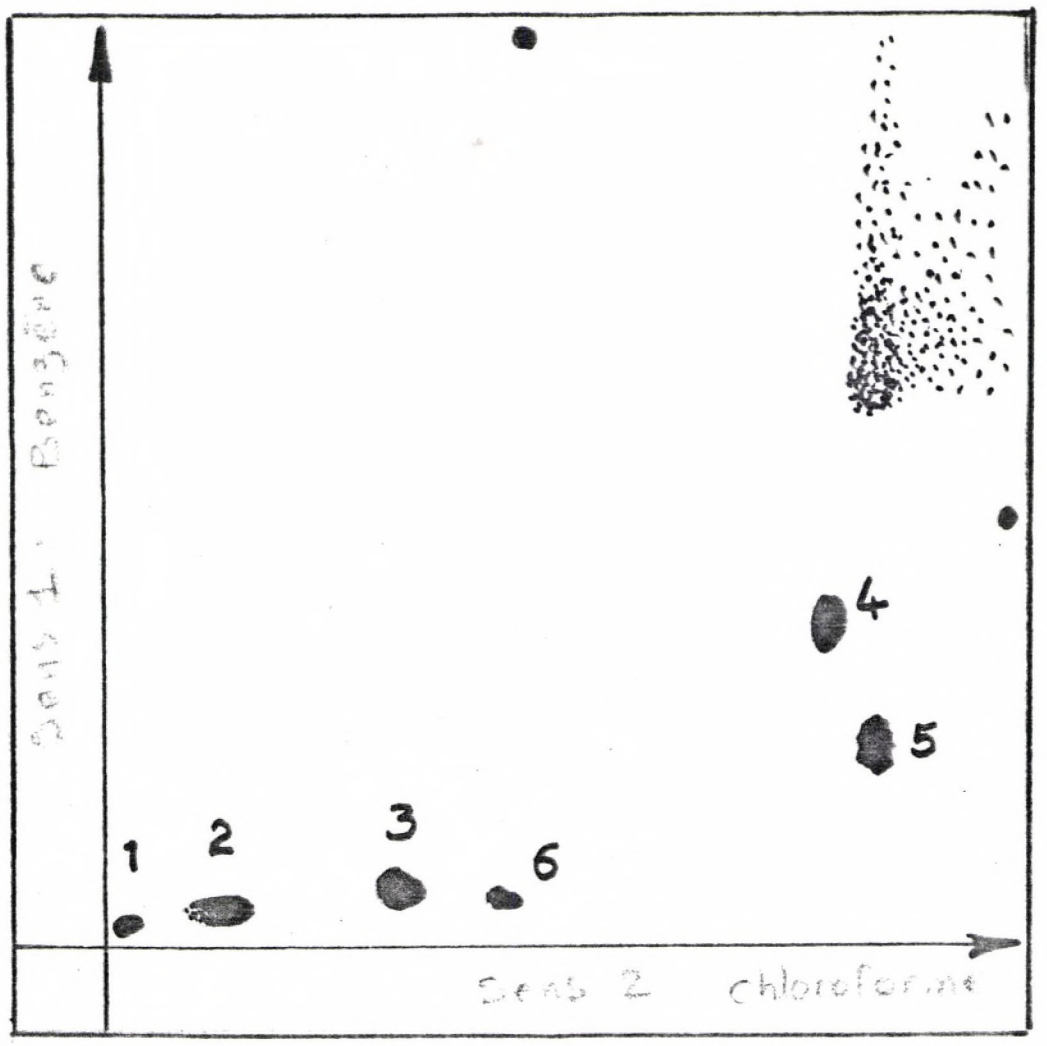


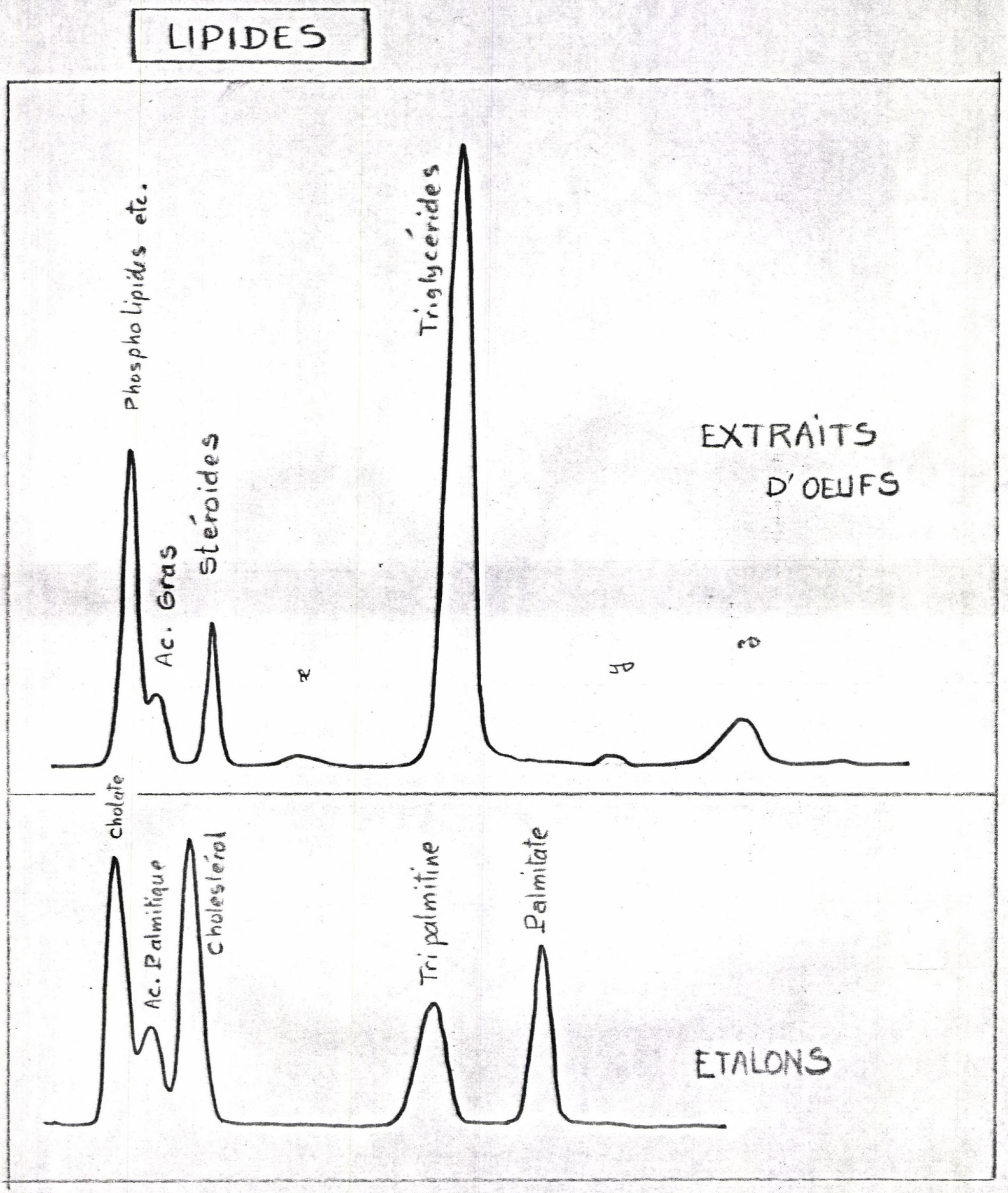
Fig. 2 - distribution de fréquences de la concentration protéique de la fraction F_1 en fonction des Castes et de l'année chez Apis mellifica, mellifica. L.

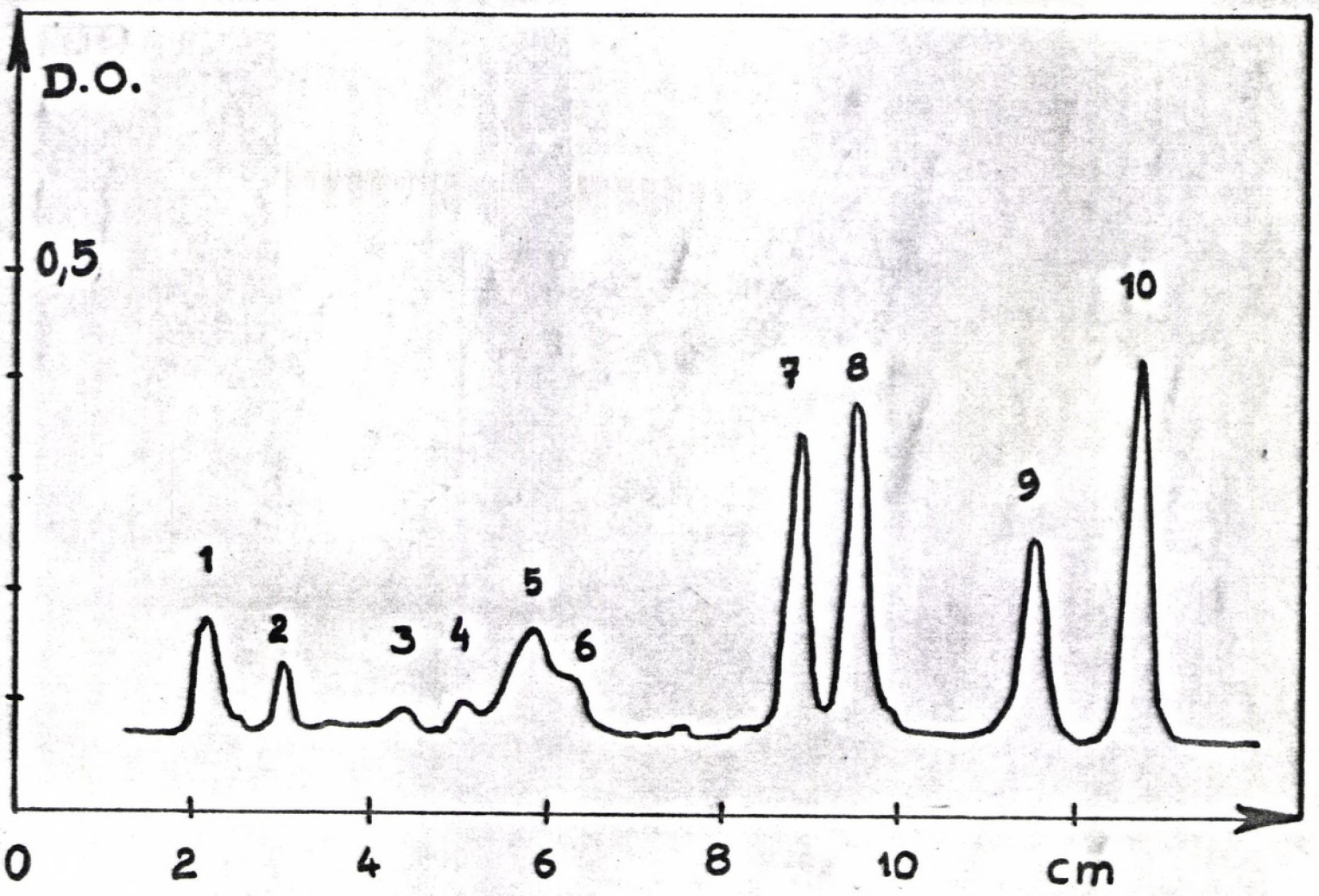


1. Cholate
2. Ac. palmitique
3. Cholestérol
4. Palmitate de Méthyle
5. Tripalmitine.
6. Diglycéride (impureté.)

Fig. 3. Séparation bi dimensionnelle des classes de Lipides.

Fig. 4 - Séparation uni-dimen-
-sionnelle des classes de Lipides -
Application aux œufs d'Ephestia





1. Chlorophyllides
2. Néo-xanthine
3. non identifieé (xanth.)
4. Viola xanthine
5. Lutéine
6 - Dérivé de la Luteine
7 - Chlorophylle b
8. Chlorophylle a
9 - Phéophytine a
10 - β Carotène

Fig. 5 Séparation quantitative des pigments photosynthétiques : application aux feuilles de Diffenbachia.

GLUCIDES

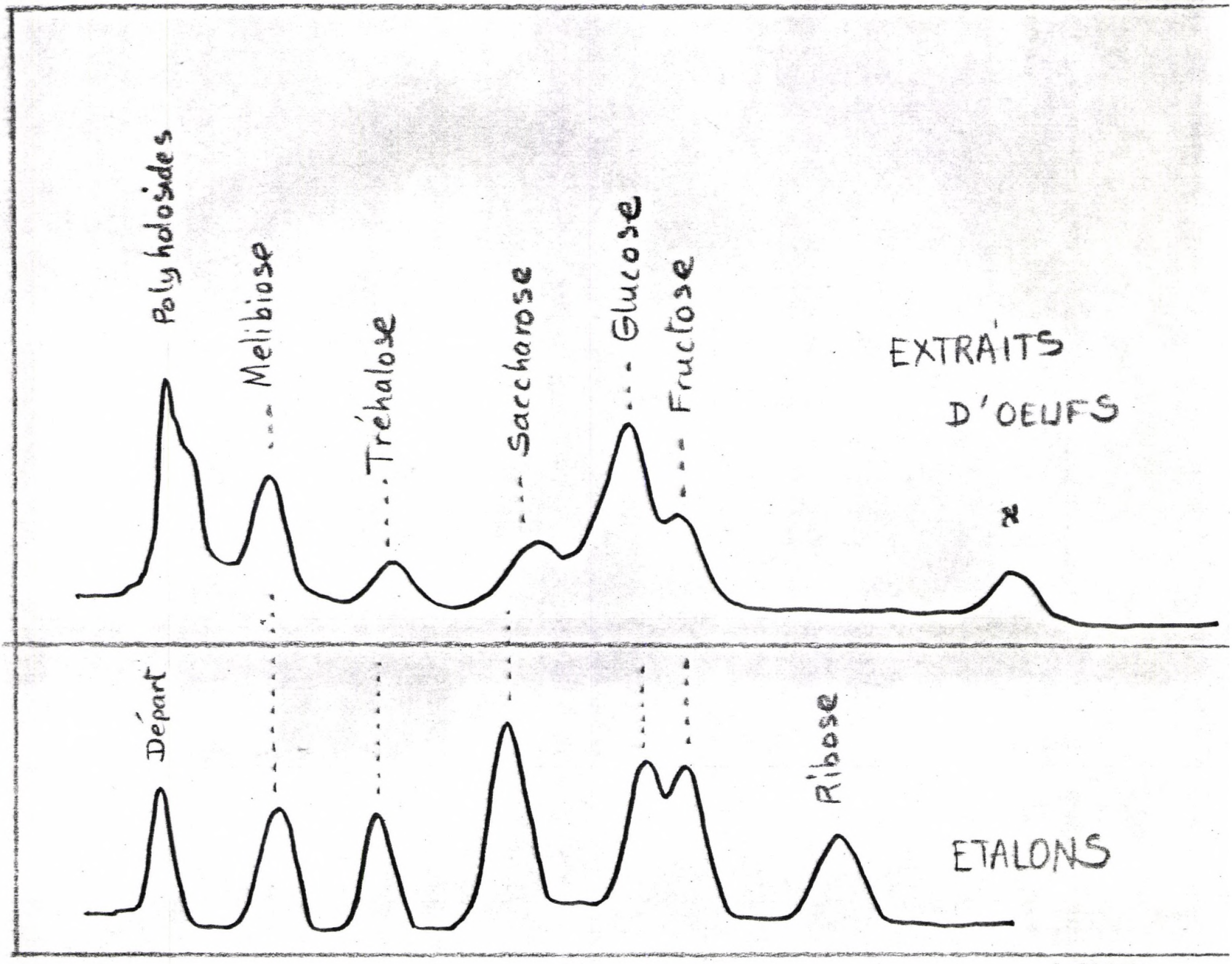


Fig. 6 - Analyse des lipides dans les œufs d'Ephestia -

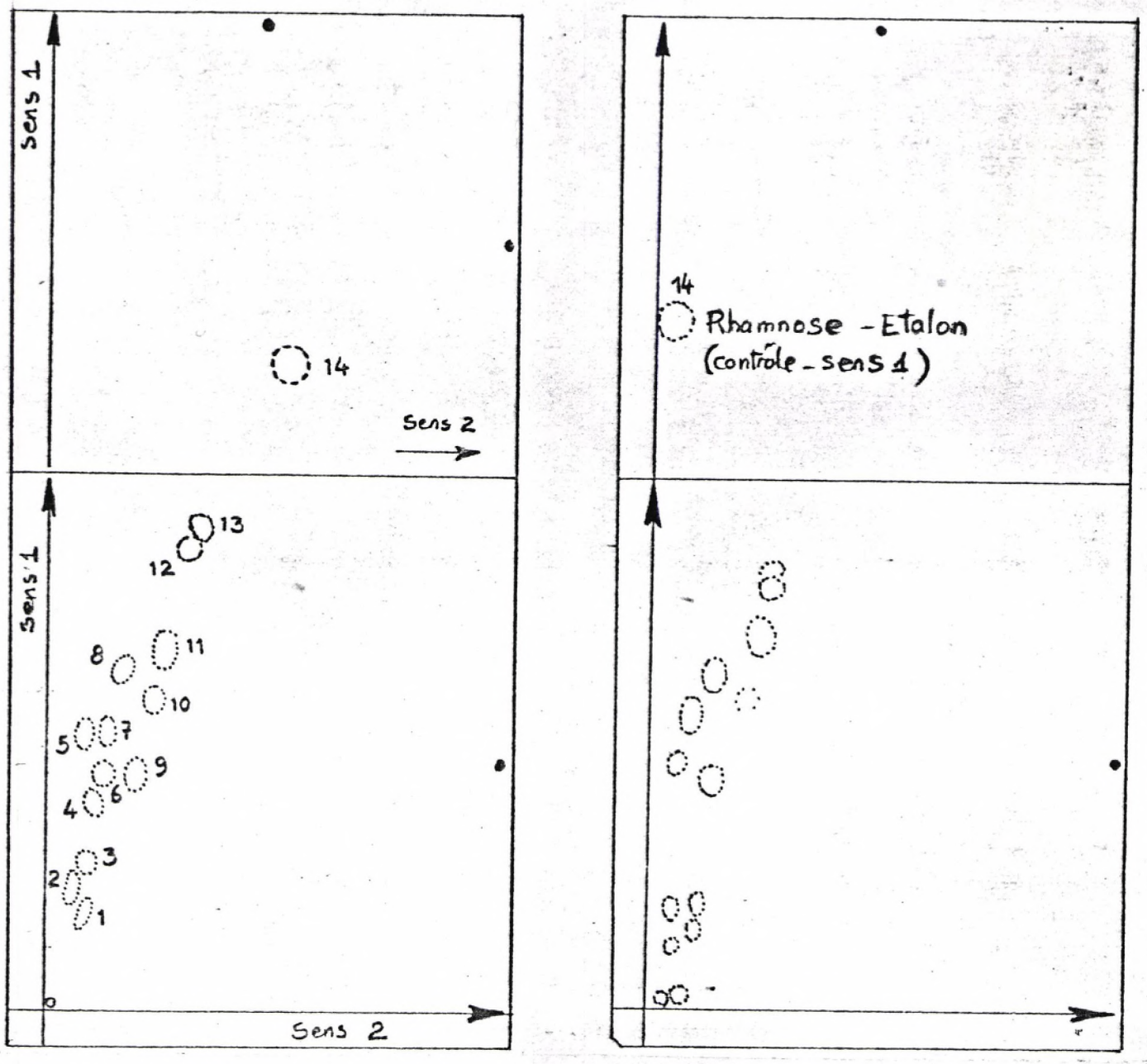


Fig. 7 - Séparation des glucides (dans le système bidimensionnel)

Application aux oeufs d'Ephestia -

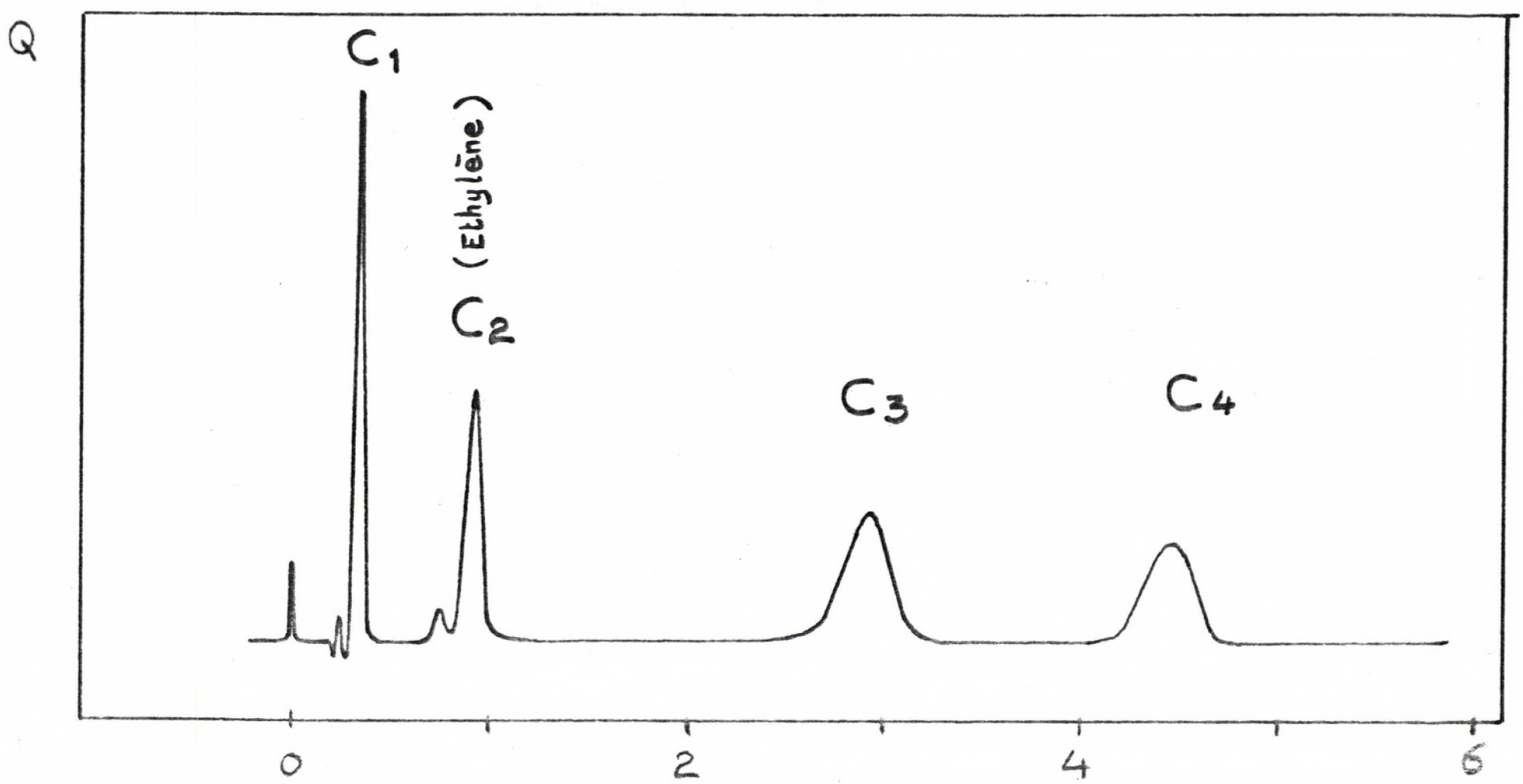


Fig. 8 - Les constituants volatils à faible température dégagés par les pommes "Golden" Analyse de l' Ethylène (C.P.G.).

EXEMPLE D'ANALYSE TOPIQUE.

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE
I.N.R.A.
DÉPARTEMENT DE ZOOLOGIE
Laboratoire de Biochimie
C. R. A. D'AVIGNON
84140 CANTAREL-MONTFAVET

RESULTATS D'ANALYSES

1

Demandeur : M. D'Arcier, Station de Zoologie

Date : Août 75

Objet : Analyse d'Acide Ascorbique dans des milieux d'élevage présentant au départ des anomalies de coloration.

Technique : colorimétrique au dichloro 2-6-Phénol Indo Phénol
Extraction au Potter en milieu Acide acétique + Méta Phosphorique
(100 mg de milieu ramenés à 10 ml de solution).
Etalon : Ac. Ascorbique pour usage Bioch. Merck

Etalonnage : 0,1 mg D.C.P.I.P. réduits par :
0,1528 mg d'ac. asc. ($N = 4$; $s_x = 0{,}000957$)

Dosages :

1er Milieu (Clair = Témoin) - (Numéro 3)
$\bar{x} = 0{,}4500$ mg/g ($N = 6$) $s_x = 0{,}0270$

2e Milieu (bruni) - (Numéro 1)
$\bar{x} = 0{,}4783$ mg/g ($N = 5$) $s_x = 0{,}01244$

3e Milieu (bruni) - (Numéro 2)
$\bar{x} = 0{,}5420$ mg/g ($N = 8$) $s_x = 0{,}01155$

Conclusion - Le brunissement n'est pas dû à un défaut d'ac. ascorbique

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE
I.N.R.A.
DÉPARTEMENT DE ZOOLOGIE
Laboratoire de Biochimie
C. R. A. D'AVIGNON
84140 CANTAREL-MONTFAVET

FICHES PROGRAMMES

PRESENTATION GENERALE

La préparation d'une fiche pour chaque programme conduit à une multiplicité de documents pouvant donner une idée fausse de l'homogénéité réelle des activités du laboratoire de biochimie.

C'est pourquoi les tableaux suivants présentent de manière synthétique l'ensemble des sujets abordés. Tous ont pour objectif agronomique final la lutte contre les insectes "ravageurs".

THEMES PRINCIPAUX OU OBJECTIFS DIRECTS	Critères biochimiques Fondamentaux	Glucides	Lipides	Protides	Enzymologie	Vitamines, (c) Cofacteurs, Pigments
	Comparaison des races, hybrides, écotypes...	Miels / Miellats	Noctuidés	Abeille Noctuidés	Abeille Noctuidés	Abeille (ptérines)
	Détermination des constituants pour la nutrition et l'élevage. (Biochimie descriptive)	Pucerons (+ Pêchers + Coccinelles) Oeufs d' [Ephestia Abeille	Pucerons Oeufs d'Ephestia	Pucerons (pêchers) (coccinelles)	Abeille	Miels
	Régulation métabolique et enzymatique (Biochimie dynamique).	Abeille	Noctuidés (projet)	Abeille	Abeille Noctuidés (projet)	Lépidoptères phytophages (vitamine C)
	Agronomie Maturation des fruits	cerises (1974) pommes (1977?)	Pommes (Ethylène)	–	– Pommes (1977?)	Cerises (1974)

(Les détails figurent dans le texte au chapitre VIII p. 16-18 du rapport)

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE
I.N.R.A.
DÉPARTEMENT DE ZOOLOGIE
Laboratoire de Biochimie
C. R. A. D'AVIGNON
84140 CANTAREL-MONTFAVET

INVENTAIRE DES SUJETS EN COURS D'ETUDE

Nº de Projet	Thème général (critères biochimiques)	Sujets
73010 *	Détermination de la Protéinémie	Apis mellifica
74010	Protéinémie comparée	Apis (races)
75010	" "	Noctua (lignées)
73020 *	Vitamine C (oxydation, transit)	Chilo
74020 *	Acide déhydro ascorbique	Lasperesia
74030	Glycémie (évolution, régulation)	Apis mellifica
74050 *	Constituants glucidiques	Miels, Miellats
74060	" "	Myzus persicae
74070	" "	Ephestia (oeufs)
75020	Constituants lipidiques	" "
76010	" "	Noctuidés
74040	α-Glucosidases (cinét., régul.).	Apis mellifica
74041 *	Phosphatase alcal. intestinale.	" "
74042	Estérases (et Lipases).	" "
7503	Pigments lipo et hydrosolubles.	Miels, Pollens
7408 *	Ptérines oculaires.	Apis mellifica

NB. Les sujets marqués d'un astérisque (*) ont abouti ou sont provisoirement suspendus en tant que programmes complets, compte tenu des résultats acquis, et des priorités.